Mikrochemischer Nachweis der Flechtenstoffe.

VIII. Mitteilung.

Von Y. ASAHINA

朝比奈泰彥： 地衣成分ノ顯微化學的證明法（其八）

Specieller Teil (Fortsetzung).

Nachtrag zum Nachweis der Squamatsäure.[1]

Wird eine Spur der Squamatsäure unter dem Deckglas unter Zusatz von der G.A. An-Lösung erwärmt, so scheidet sich das Anilinsalz in Form von farblosen, rhomboedrischen, derben Prismen (Fig. 81). In Gegenwart von der Usninsäure (z. B. *Cladonia bellidiflora*) wird die Bildung des sehr charakteristischen Anilinsalzes nicht gestört, indem die Usninsäure dabei klar aufgelöst wird. Kommt aber die Bæomycessäure zugleich vor (z. B. *Thamnolia subvermicularis*), so wird dessen Bildung gestört: dann muss man die Squamatsäure durch die Bildung des Kaliumsalzes nachweisen.

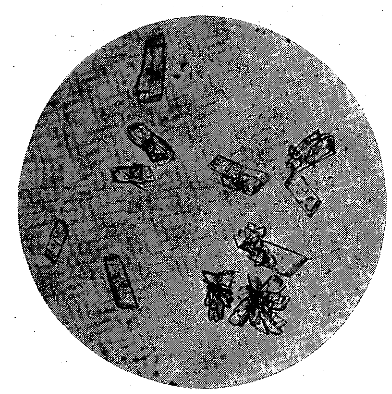


Fig. 81.

VII. Nachweis der Flechtenstoffe, die mit aromatischen Basen (Anilin, o-Toluidin, Benzidin und Paraphenylendiamin) gelbe oder rote Kondensationsprodukte bilden.

Von Y. ASAHINA und M. MITUNO.

1. Thamnolsäure ($C_{19}H_{16}O_{11}$).

Die Thamnolsäure ist schwerlöslich in meisten Lösungsmitteln: man ex-

[1] Dieser Nachtrag ist vor dem „Versuchsbeispiel" (diese Journ. XIV., s. 44 [1938]) zu setzen. Dort ist der Auslöschungswinkel des squamatsauren Pyridins als φ=ca 29° zu berichtigen.

trahiert sie am besten mit heissem Aceton (unter Anwendung vom Bürettenröhrchen). Die alkoholische Lösung färbt sich mit Eisenchlorid braunrot. Es gelingt nicht unter dem Deckglas durch Umlösen aus der G.E.-Lösung gut ausgebildete Krystalle zu gewinnen.

Beim Betupfen mit der Paraphenylendiamin-Lösung färben sich die Thalli der thamnolsäurehaltigen Flechten genau so wie die der fumarprotocetrarsäurehaltigen orangerot bis rot. Alkalilauge erzeugt auf den ersteren tiefgelbe, nach einiger Zeit dunkelrot werdende Flecke, während sich die Fumarprotocetrarsäure mit Alkali bräunlich färbt.

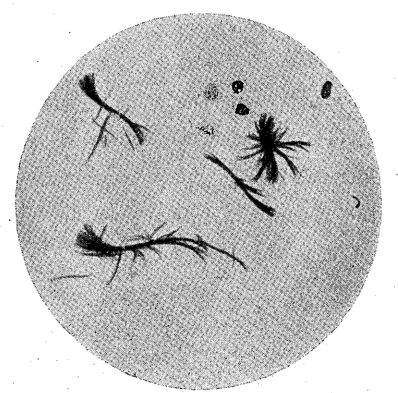


Fig. 82.

Wird eine Spur der Säure unter dem Deckglas mit der 10% igen Kalilauge versetzt, so löst sie sich darin mit intensiv gelber Farbe und bildet dann nach etwa einem Tage ʃ-förmig gekrümmte, blutrote Krystallnadeln (Fig. 82), wobei die umgebende Flüssigkeit auch rot gefärbt wird.

Zur Erkennung der Thamnolsäure eignen sich am besten die G.A. Anilin-, sowie die G.A. o-Toluidin-Lösung. Erwärmt man nämlich die Thamnolsäure unter Zusatz von der G. A. An.-Lösung, so färbt sie sich sofort tief gelb und wandelt sich unter lebhafter Kohlensäure-Entwicklung in gebüschelten oder strahlig gruppierten Nadeln um. Dieses Produkt ist das Anil der Decarbothamnolsäure (Pl. V, Fig. 1). Unter den gleichen Bedingungen bildet die Thamnolsäure mit der G.A. o-T-Lösung gelbe, strahlig gruppierte, haarfeine Trichiten (Pl. V, Fig. 2). Weder durch die G.W. Py- noch durch die G. A. Q.-Lösung wurde eine Krystallbildung erzielt.

Versuchsbeispiel : Man extrahiert ein Stück Podetium von *Thamnolia vermicularis* oder *Cladonia polydactyla* oder *Cladonia digitata* mit heissem Aceton, lässt die Lösung auf dem Objekt-träger verdunsten und prüft mit dem eingetrockneten Extrakt die oben geschilderten Reaktionen. Zur Prüfung auf Thamnolsäure in *Cladonia macilenta* extrahiert man ein Paar Podetien zunächst mit heissem Benzol, trocknet die so behandelten Podetien und extra-

hielt dann die letzteren mit heissem Aceton. Man lässt das Benzol-Extrakt verdunsten und prüft mit dem Rückstand auf Barbatinsäure (=Coccellsäure von ZOPF).[2] Das eingetrocknete Aceton-Extrakt liefert mit der G. A. An.-Lösung das charakteristische Anil der Decarbo-thamnolsäure.

2. Baeomycessäure ($C_{19}H_{18}O_8$).

Diese Saure wurde in neuerer Zeit von KOLLER und MAAS[3] in *Baeomyces roseus* PERS. aufgefunden. Dann haben ASAHINA and YASUE[4] dieselbe in *Thamnolia subvermicularis* Y. ASAHINA nachgewiesen. Die alkoholische Lösung färbt sich mit Eisenchlorid rotviolett. Die Baeomycessäure ist in meisten Lösungsmitteln schwer löslich. In Aceton ist sie aber gleich wie die Thamnolsäure löslich.

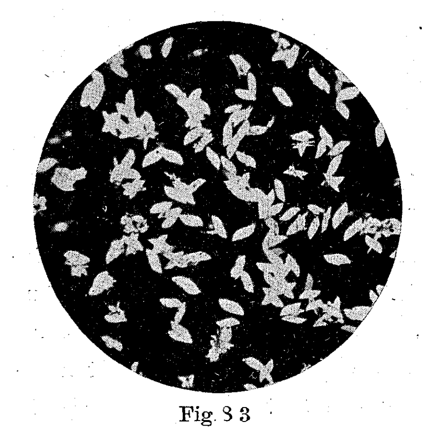


Fig. 83

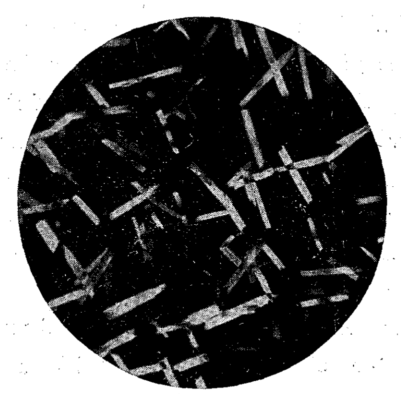


Fig. 85

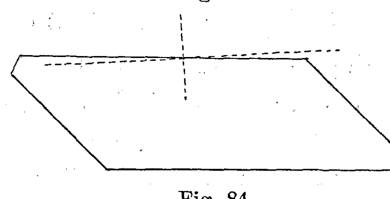


Fig. 84

Mit der G. A. Anilin-Lösung bildet die reine Bæomycessäure das in gelben, bootförmigen, dünnen Blättchen krystallisierendes Anil (Fig. 83); mit der G. A. o-Toluidin-Lösung bildet sie gelbe, haafeine Trichite, die oft igelförmige Klumpen bilden. Mit der G.A.Q.-Lösung bildet sie hell gelbe, dünne

2) Diese Journal XII, 868 (1836); XIII, 865 (1837).
3) Monatshefte f. chemie, *66*. 57 (1935).
4) Berichte d. deutsch. chem. gesell. *70*. 1496 (1937).; diese Zeitschrift XIII., 317 (1937).

Tafeln (Fig. 84; Pl. V, Fig. 3), deren Bildung, im Gegensatz zu den Anilin-, sowie o-Toluidin-Verbindungen durch das Vorhandensein der Squamatsäure nicht gestört wird. Mit der G.W. Py.-Lösung bildet die Bæomycessäure jenach den Aggregatszuständen verschieden geformtes Pyridinsalz. Die durch Umkrystallisieren gereinigte, gröberen Krystalle bilden mit der G.W. Py.-Lösung farblose, dünne Blättchen von gerader Auslöschung (Fig. 85). Dagegen bilden die fein körnigen (etwa durch Verdunsten des Aceton-Auszugs erhaltenen) Krystalle mit demselben Reagenz meistens strahlig oder baumförmig angeordnete Trichiten, daneben auch etwas viereckige Blättchen (Pl. V, Fig. 4).

Versuchsbeispiel; Das eingetrocknete Aceton-Extrakt der *Bæomyces roseus* giebt alle oben erwähnte Reaktionen. Dagegen verhält sich das Extrakt von *Thamnolia subvermicularis*, welches ein Gemisch von ungefähr gleichen Mengen Squamat- und Baeomycessäure ist, gegen die hier gebrauchten Reagentien etwas anders. Auf Zusatz von der G.A. Anilin-Lösung werden weder die derbe Prismen von squamatsaurem Anilin noch die gelbe Blättchen von bæomycessaurem Anilin erhalten. Durch die G.W. Py.-Lösung werden die dünne Blättchen (gerade Auslöschung!) und dendritische Trichite von bæomycessauren Pyridin erhalten. Erst durch die G. A.Q.-Lösung bildet die Bæomycessäure, namentlich beim Erwärmen, gelbe Blättchen von der Anilin-Verbindung, während die Squamatsäure farbloses, korniges Anilinsalz bildet. Zum endgültigen Nachweis der Squamatsäure in *Thamnolia subvermicularis* eignet sich am besten das Kaliumsalz, das man durch Zusatz von 10–20% iger Kaliumcarbonatlösung erhält.

3. **Salazinsäure** ($C_{18}H_{12}O_{10}$).

Die Salazinsäure bildet mit der carbonathaltigen Kalilauge (5% KOH+20 % K_2CO_3) blutrote, x-förmig gebüschelte Nadeln. Wird eine Spur Salazinsäure mit der G.A. Anilin-Lösung versetzt, so scheidet sich das Dianil in Form von gelben Wärzchen, die aus rhombischen Blättchen zusammengesetzt sind (Fig. 86). Mit der G.A. o-Toluidin-Lösung bildet die Salazinsäure, namentlich bei schwachem Erwärmen, gelbe, spindelförmige Blättchen von symmetrischer Auslöschung (Fig. 87; Pl. V, Fig. 5). Mit der G.A.Q.-Lösung bildet die Salazinsäure gelbe, warzenförmige Drusen, die aus winzigen, rhombischen Täfel-

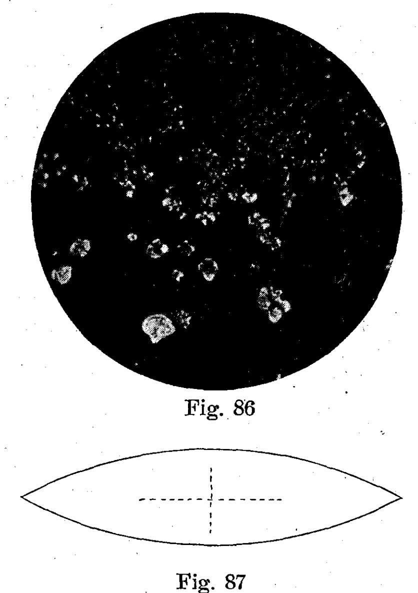


Fig. 86

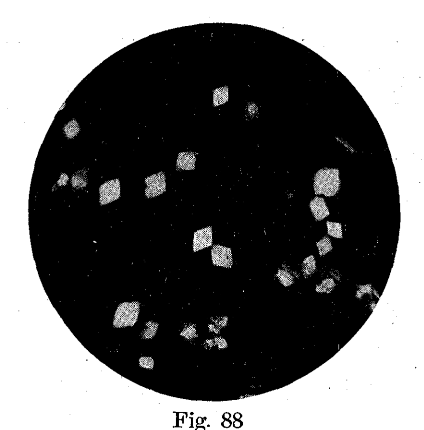


Fig. 88

Fig. 87

chen bestehen (Fig. 88).

Versuchsbeispiel: Man extrahiert Thallus-Schnitzel von *Parmelia cetrata* oder *Parmelia saxatilis* zunächst mit heissem Benzol (um Atranorin u.s.w. zu beseitigen) und dann mit heissem 85% igem Aceton. Die so erhaltenen, eingetrockneten Extrakte geben alle oben erwähnte Reaktionen.

4. **Stictinsäure** ($C_{18}H_{14}O_9$).

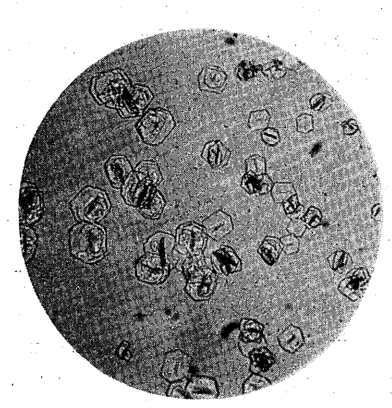


Fig. 89 a

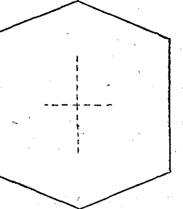


Fig. 89 b

Die Stictinsäure löst sich in Alkalilauge mit gelber Farbe, wobei sich kein geformtes Salz ausscheidet. Beim Betupfen mit der G.A. Anilin-, sowie mit der G.A. o-Toluidin-Lösung bildet die Stictinsäure unter dem Deckglas dünne, hell gelbe, sechsseitige Tafeln von gerader Auslöschung (Fig. 89 a, b; Pl. V, Fig. 6). Auch in Gegenwart von der Norstictinsäure wird die Bildung des Dianils nicht gestört.

Versuchsbeispiel : Die Stictinsäure extrahiert aus *Lobaria pulmonaria*,[5] sowie aus *Stereocaulon*- arten enthält in der Regel mehr oder weniger Norstictinsäure. Das eingetrocknete Aceton-Extrakt der genannten Flechten wird beim Versetzen mit Kalilauge grösstenteils mit gelber Farbe gelöst, hinterlässt aber eine Spur gelbrote Nädelchen (Norstictinsäure !). Beim Versetzen mit der G.A. An.- oder der G.A.o-T.-Lösung bemerkt man aber die sofortige Bildung der sechsseitigen Anile. Zum Nachweis der Stictinsäure in *Parmelia pertusa* extrahiert man die Thalli zunächst mit heissem Benzol (Entfernung vom Atranorin) und dann mit heissem Aceton. Das so erhaltene Aceton-Extrakt besteht hauptsächlich aus der norstictinsäurefreien Stictinsäure.

5. **Norstictinsäure** ($C_{19}H_{14}O_9$).

Diese Säure wurde zuerst von ASAHINA u. YANAGITA[6] in *Lobaria pulmonaria*-Exemplar aus Sachalin entdeckt. Später wurde sie in *Parmelia acetabulum* und *Usnea japonica* nachgewiesen. Zum schnellen Nachweis eignet sich das Kaliumsalz, welches sich auf Zusatz von der stark carbonathaltigen Kalilauge (5% KOH+10% K_2CO_3) oder Kaliumcarbonat allein in Form von geraden gelbroten Nadeln ausscheidet. Auch mit den organischen Basen bildet die Norstinsäure charakteristische Kondensationsprodukte.

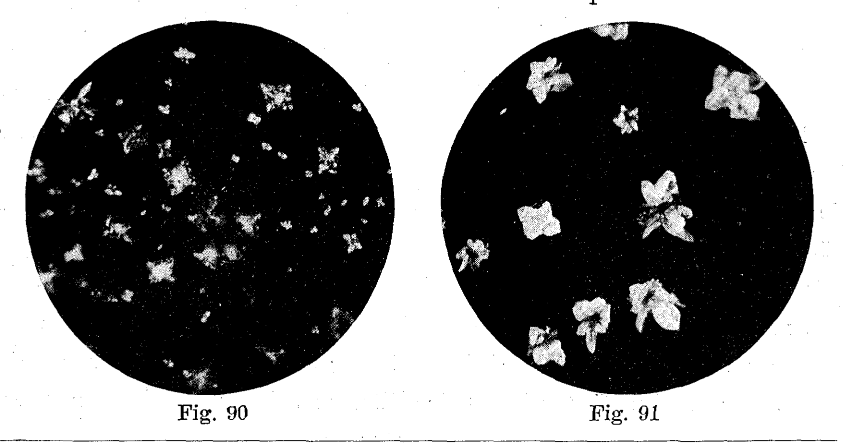


Fig. 90 Fig. 91

[5] Diese Journal, XII., 567 (1936); SCHINDLER: Ber. d. deutsch. Bot. Gesell., LIV.' 240 (1936).

[6] Berichte d. deutsch. Chem. Gesell., 67 799, (1934).

Betupft man eine Spur Norstictinsäure unter dem Deckglas mit der G. A. Anilin-Lösung (ohne Erwärmen!), so entsteht sofort gelbe, warzenförmige Krystalldrusen, die meistens aus rhombischen Blättchen bestehen. Manchmal werden die letzteren an beiden Spitzen abgestutzt und dann bilden sechsseitigen Täfelchen. Mit der G.A. o-Toluidin-Lösung bildet die Norstictinsäure auch Kondensationsprodukt, welches sich, namentlich beim Erwärmen, in Form von hellgelben, sehr dünnen, viereckigen Tafeln ausscheidet. (Fig. 90).

Mit der G.A.Q.-Lösung erwärmt bildet die Norstictinsäure hellgelbe, spindelförmige, dünne Blättchen, die meistens zu warzigen Aggregaten vereinigt sind (Fig. 91).

Versuchsbeispiel: Das eingetrocknete Aceton-Extrakt von *Parmelia acetabulum* oder von *Cladonia subcariosa* giebt alle oben erwähnte Krystallbildungen. Bei der *Usnea japonica* beseitigt man zuerst durch Extrahieren mit Benzol oder Chloroform die Usninsäure, dann extrahiert mit Äther (unter Anwendung von Bürette-Röhrchen). Das Äther-Extrakt enthält hauptsächlich die Norstictinsäure, während die Salazinsäure noch im Thallus zurückbleibt und erst mit heissem Aceton extrahierbar ist.

6. **Psoromsäure** ($C_{18} H_{14} O_8$).

Die Psoromsäure lässt sich aus dem Flechten-Thallus auf dem Objektträger durch Zutropfen von kaltem Aceton bequem extrahieren. Die alkoholische Lösung färbt sich mit Eisenchlorid weinrot. Durch Kalilauge wird die Psoromsäure nur hell gelb gelöst. Erwärmt man eine Spur der Säure unter dem Deckglas mit der G.E.-Lösung, so scheiden sich beim Erkalten pinselförmig gebüschelte, feine Nadeln, die sich oft so gross ausbilden, dass man mit dem nackten Auge beobachten kann (Fig. 92). Mit der G. A. Anilin-Lösung bildet die Psoromsäure gelbe Körnchen, die sich weder durch Erwärmen noch bei längerem Stehen keine gut ausgebildete Krystalle geben. Mit der G.A. o-Toluidin-Lösung bildet sie gelbe, winzige gerade Stäbchen. (Fig. 93).

Versuchsbeispiel: Das Markgewebe der psoromsäurehaltigen Flechten (z. B. *Alectoria sulcata, Cladonia alpicola* u.a.) färben sich durch Parapheny-

lendiamin- Lösung tief gelb. Dagegen durch Alkalilauge wird es nur hellgelb oder kaum gefärbt. Bei der *Alectoria sulcata* entfernt man zunächst das Atranorin mittels Benzols und extrahiert dann die Psoromsäure mit Aceton.

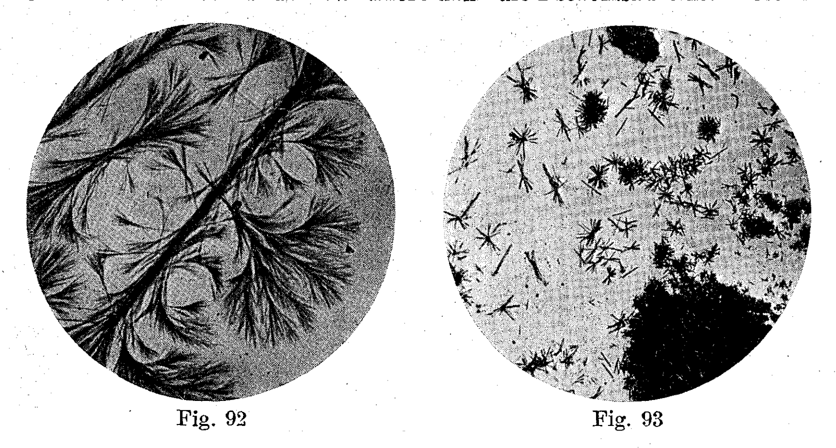


Fig. 92 Fig. 93

7. **Protocetrarsäure** ($C_{18}H_{14}O_9$) und **Fumarprotocetrarsäure** ($C_{22}H_{16}O_{12}$).

Diese beiden Säuren zeichnen sich durch die orangerote bis rote Färbung durch die Paraphenylendiaminlösung aus (PD-Reaktion). Um die beiden von einander scharf zu unterscheiden kommen zunächst die verschiedene Löslichkeit in Betracht. Man kann nämlich die Protocetrarsäure, wenn auch schwierig, doch durch die lang dauernde Extraktion mit Äther vom Flechtenthallus herauslsöen, während sich die Fumarprotocetrarsäure erst mit heissem Aceton langsam extrahieren lässt. Beim Erhitzen auf ca 300° liefert die Fumarprotocetrarsäure ein in Säulen krystallisiertes Sublimat von der Fumarsäure (Fig. 94), während dies bei der Protocetrarsäure nicht geschieht.

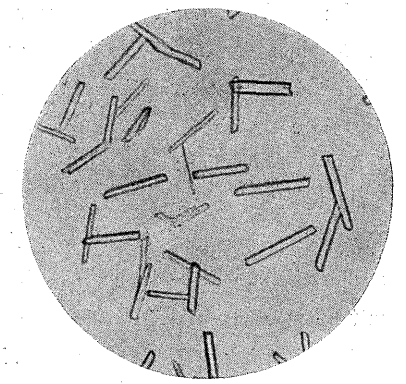


Fig. 94

Mit der G. A. Anilin-Lösung bildet die Fumarprotocetrarsäure lange, strahlig gruppierte, gelbe Nadeln (Fig. 95 a) ; mit der G. A. o-Toluidin-

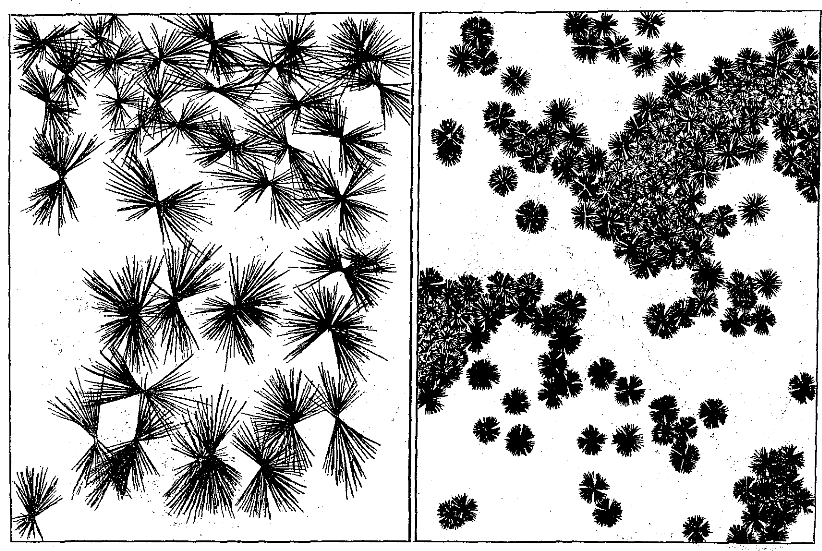


Fig. 95 a. Fig. 95 b.

Lösung bildet sie zwar haarförmige Trichite, die aber leicht löslich sind und allmählich schwinden. Dagegen bildet die Protocetrarsäure mit der G. A. o-Toluidinlösung sofort winzige gelbe Sphærokrystalle. Einzelnes Körnchen ist kaum 17 μ dick und zeigt unter Polarisationsmikroskop mit gekreuzten Nikolschen Prismen dunkles Kreuz (Fig. 95 b). Mit der G.A. Anilinlösung bildet die Protocetrarsäure ähnliche Krystallaggregate, die aber mehr sternförmig erscheinen.

Versuchbeispiel: Zu raschem Extrahieren von Protocetrāure aus den Flechten für den mikrochemischen Zweck eignet sich immer noch das Aceton. Man extrahiert das Thallus-Schnitzel von *Ramalina farinacea* (aus Europa) zunächst mit heissem Benzol. Die so von Usninsäure befreite Thalli werden mit heissem Aceton im Büretten-röhrchen extrahiert und der Auszug wird auf dem Objektträger verdunstet. Man kratzt den scharf getrockneten Rückstand mit einem Messer, häuft zusammen, betupft mit einem Tropfen G. A. o-Toluidin-Lösung und bedeckt mit dem Deckglas. Sofort entsteht die gelben Sphaerokrystalle vom o-Toluidino-protocetrarsäure. Bei der Parmelia caperata entfernt man zuerst die Caperatsäure und die Usninsäure durch Extraktion mit heissem Äther oder Benzol und extrahiert die zurückbleibende

Caprarsäure (=Protocetrarsäure) mit heissem Aceton.

Zum Nachweis der Fumarprotocetrarsäure in *Cladonia furcata* extrahiert man die Flechte mit heissem, wasserhaltigem Aceton (85%), lässt den Auszug auf dem Objektträger verdunsten und verfährt mit dem scharf getrockneten Rückstand wie oben bei *Ramalina farinacea*, wobei aber hier mit der G. A. Anilinlösung betupft werden muss. Es entsteht allmahlich die strahrig gruppierte, lange Nadeln vom Anil der Fumarprotocetrarsäure. Beim Versuche mit der Cetraria islandica extrahiert man die letztere zunächst mit Äther und erschöpft dann die so von der Protolichesterinsäure befreiten Thalli mit heissem 85% igem Aceton. Später verfährt man wie bei *Cladonia furcata*.

(*Fortsetzung folgt*).

Erklärung der Tafel V.

1. Anilin-Kondensationsprodukt der Decarbo-thamnolsäure. 2. o-Toluidinkondensationsprodukt der Decarbo-thamnolsäure. 3. Chinolinsalz der Bæomycessäure. 4. Pyridinsalz der Bæomycessäure. 5. 0-Toluidin-kondensationsprodukt der Salazinsäure. 6. o-Toluidin-kondensationsprodukt der Stictinsäure.

日本產さんごごけ屬ノ地衣ニ就テ

三 ツ 野 問 治

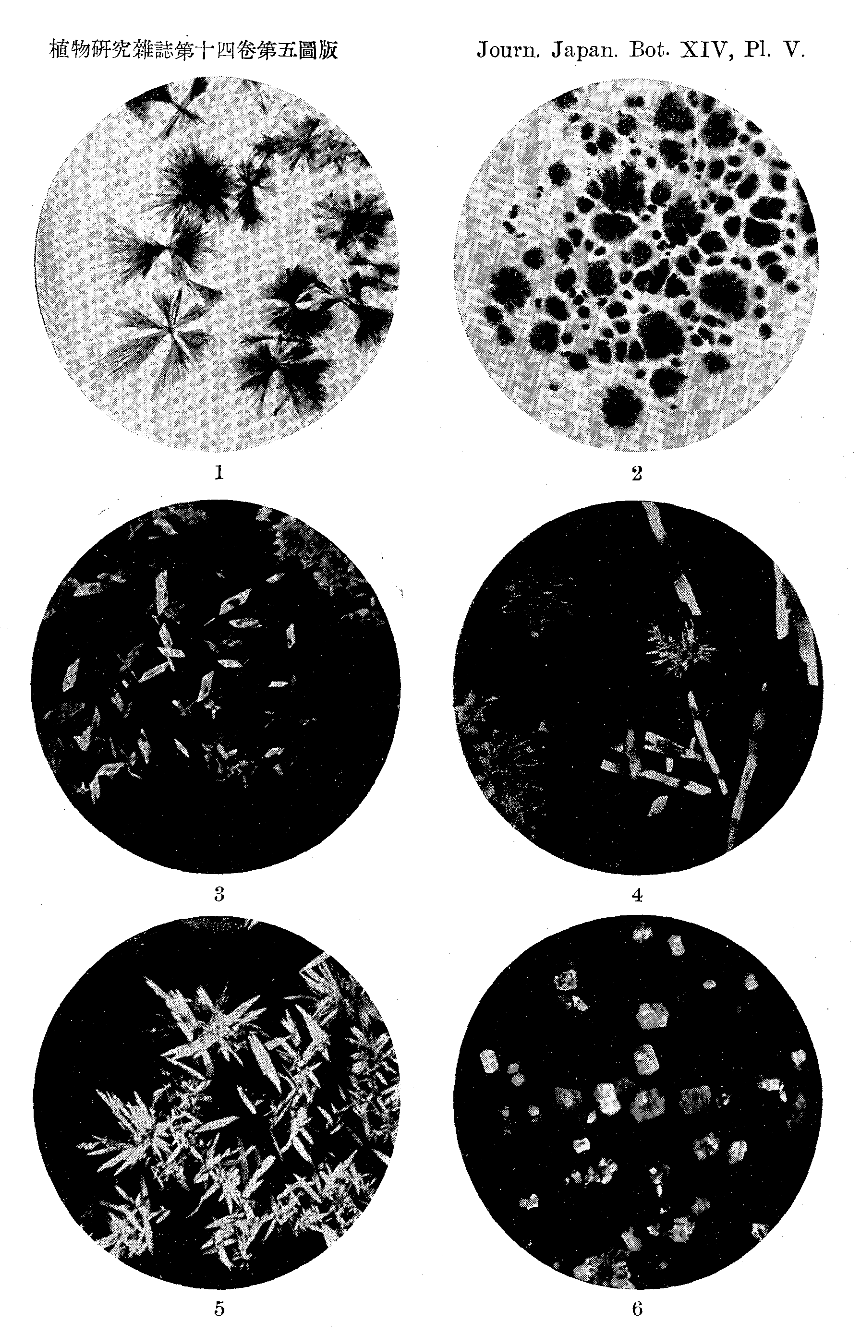
M. MITUNO: *Sphærophorus*-Arten aus Japan.

日本產さんごごけ屬ノ研究ニ關シテハ既ニ佐藤正己氏[1]ノ發表ガアル。氏ハ從來既知ノモノヲ整理シテ5種ト1亞種トシ、各々ノ記載並ニ生態ヲ記述シテ居ル。著者ハ朝比奈教授指導ノ下ニ、解剖學的、顯微化學的方面ヲ主トシテ同屬ノ再檢討ヲ行ヒ、併セテ今迄ニ知ラレテ居ル分布狀態ヲ調査シ報告スル。

其レニ先ダチ佐藤氏ノ論文中ノ學名ニ就イテ一言スル必要ガアル。佐藤氏ガ

---

[1] 本誌 X, p. 424 (1934).



Y. ASAHINA : Mikrochemischer Nachweis der Flechtenstoffe (VIII)

朝比奈泰彥： 地衣成分ノ顯微化學的證明法（其八）